



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑩ **DE 691 20 146 T 2**

U 12 N 10/13
A 01 K 87/027

DE 691 20 146

- | | | |
|---|---|----------------|
| ② | Deutsches Aktenzeichen: | 691 20 146.3 |
| ⑧ | PCT-Aktenzeichen: | PCT/US91/00245 |
| ⑧ | Europäisches Aktenzeichen: | 91 903 098.1 |
| ⑦ | PCT-Veröffentlichungs-Nr.: | WO 91/10741 |
| ⑧ | PCT-Anmeldetag: | 11. 1. 91 |
| ⑦ | Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: | 25. 7. 91 |
| ⑧ | Erstveröffentlichung durch das EPA: | 2. 1. 92 |
| ⑦ | Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: | 12. 8. 98 |
| ④ | Veröffentlichungstag im Patentblatt: | 12. 12. 98 |

③ Unionspriorität: ③② ③③ ③①

12.01.90 US 486008 08.11.90 US 810515

⑦③ Patentinhaber:

Cell Genesys, Inc., Foster City, Calif., US

⑦④ Vertreter:

Hoffmann, Eitle & Partner Patent- und
Rechtsanwälte, 81925 München

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL,
SE

⑦② Erfinder:

KUCHERLAPATI, Raju, Darien, CT 06820, US;
JAKOBOVITS, Aya, Menlo Park, CA 94025, US

⑧④ ERZEUGUNG XENOGENER ANTIKÖRPER

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 691 20 146 T 2

18. Juli 1996

EP-Anmeldung Nr. 91 903 098.1

62 846/ MÜ

1

B E S C H R E I B U N G

Technisches Gebiet

Technisches Gebiet der Erfindung ist die Herstellung von xenogenen, spezifisch bindenden Proteinen in einem lebensfähigen, Nichtprimaten-Säugetierwirt.

Hintergrund

Monoklonale Antikörper finden in der Diagnose und der Therapie Verwendung. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bindung an ein spezifisches Epitop können sie in besonderer Weise zur Identifizierung von Molekülen, die dieses Epitop tragen, verwendet werden oder sie können als solche oder in Verbindung mit einem anderen Rest für die Diagnose oder Therapie zu einer spezifischen Stelle dirigiert werden.

Monoklonale Antikörper enthalten schwere und leichte Ketten, die unter Definition einer bindenden Region für das Epitop verbunden sind. Die einzelnen Ketten bestehen aus einer variablen Region und einer konstanten Region. Die Aminosäuresequenz der konstanten Region ist für einen speziellen Isotyp des Antikörpers sowie für den Wirt, der den Antikörper bildet, spezifisch.

Aufgrund der Beziehung zwischen der Sequenz der konstanten Region und der Spezies, von der der Antikörper gebildet wird, kann die Einführung eines xenogenen Antikörpers in das vaskuläre System des Wirts eine Immunantwort hervorrufen. Sofern der xenogene Antikörper im Fall von chronischen Erkrankungen wiederholt eingeführt werden kann, ist es un- zweckmäßig, den Antikörper zu verabreichen, da er rasch zerstört wird und eine nachteilige Wirkung aufweisen kann. Es wurden daher zahlreiche An- strengungen unternommen, um eine Quelle für syngene oder allogene Anti- körper bereitzustellen. Eine Technik beinhaltet die Verwendung der rekombinanten DNA-Technik, bei der die Gene für die schweren und leichten Ket- ten des Wirts identifiziert und die Regionen, die für die konstante Re- gion kodieren, isoliert wurden. Diese Regionen wurden mit dem für die va- riable Region kodierenden Bereich von anderen Immunglobulin-Genen einer

anderen Spezies, die auf ein spezielles Epitop abgestellt sind, verbunden.

Obgleich der dabei erhaltene chimäre, teilweise xenogene Antikörper im wesentlichen besser geeignet als ein vollständig xenogener Antikörper ist, weist er immer noch eine Anzahl von Nachteilen auf. Die Identifikation, Isolierung und Verbindung der variablen und konstanten Regionen erfordert einen erheblichen Arbeitsaufwand. Ferner kann die Verbindung einer konstanten Region einer Spezies mit einer variablen Region einer anderen Spezies die Spezifität und Affinität der variablen Regionen verändern, so daß die erwünschten Eigenschaften der variablen Region verlorengehen. Ferner gibt es in der variablen Region Rahmensequenzen und hypervariable Sequenzen, die für eine Spezies spezifisch sind. Diese Rahmensequenzen und hypervariablen Sequenzen können zu unerwünschten antigenen Antworten führen.

Daher wäre die Bildung von allogenen Antikörpern zur Verabreichung an einen Wirt durch Immunisieren des Wirts mit einem interessierenden Immunogen besonders wünschenswert. Für Primaten, insbesondere Menschen, ist diese Möglichkeit nicht zweckmäßig. Die humanen Antikörper, die erzeugt worden sind, beruhen auf dem zufälligen Vorhandensein einer verfügbaren Milz aus einem Wirt, der vorher mit dem interessierenden Epitop immunisiert worden ist. Während humane periphere Blutlymphozyten zur Erzeugung von monoklonalen Antikörpern verwendet werden können, haben sich diese bei Fusionen nicht als besonders erfolgreich erwiesen und üblicherweise nur zu IgM geführt. Außerdem ist es besonders schwierig, eine humane Antikörperantwort gegen ein humanes Protein zu erzeugen, was bei zahlreichen therapeutischen und diagnostischen Anwendungen angestrebt wird. Daher besteht ein erhebliches Interesse am Auffinden von alternativen Wegen zur Erzeugung von allogenen Antikörpern für Menschen.

Einschlägige Literatur

Thomas und Capecchi, Cell, Bd. 51 (1987), S. 503-512; Koller und Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 86 (1989), S. 8932-8935 beschreiben die Inaktivierung des β_2 -Mikroglobulin-Locus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen. Berman et al., EMBO J., Bd. 7 (1988), S. 727-738 beschreiben den humanen Ig VH-Locus. Burke et al., Science, Bd. 236 (1987), S. 806-812 beschreiben künstliche Hefe-Chromosomenvektoren; vgl. auch Garza et al., Science, Bd. 246 (1989), S. 641-646 sowie Brownstein et al., Science, Bd. 244 (1989), S. 1348-1351. Sakano et al. beschreiben ein Diversitätssegment der Gene für schwere Immunoglobulin-

linketten (Sakano et al., Nature, Bd. 290 (1981), S. 562-565). Tucker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 78 (1981), S. 7684-7688 beschreiben die Gensequenz der schweren Kette von Mäuse-IgA. Blankenstein und Kruwinkel, Eur. J. Immunol., Bd. 17 (1987), S. 1351-1357 beschreiben für die Maus die variable Region der schweren Kette; vgl. auch Joyner et al., Nature, Bd. 338 (1989), S. 153-155; Traver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 86 (1989), S. 5898-5902; und Panchis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 87 (1990), S. 5109-5113. Brüggemann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 86 (1989), S. 6709-6713 beschreiben die Einführung eines schweren Ketten-Minilocus in befruchtete Mäuseeier.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

Xenogene spezifische Bindungsproteine werden in einem lebensfähigen Nichtprimaten-Säugetierwirt durch Immunisierung des Nichtprimaten-Säugetierwirts mit einem geeigneten Immunogen erzeugt.

Der Wirt ist gekennzeichnet durch: (1) seine Unfähigkeit zur Bildung eines endogenen Immunoglobulins aufgrund einer Läsion in der J-Region mindestens einer Kopie des Immunoglobulin-schwere Kette-Locus; und vorzugsweise (2) einen exogenen Immunoglobulin-Locus, umfassend mindestens eine konstante Immunoglobulin-Region; oder ein Protein davon, Immunoglobulin-Sequenzen, die für die Komponenten der variablen Region von mindestens einer der leichten und schweren Ketten sorgen, und mindestens ein Intron mit entsprechenden Spleißstellen zum Ausschneiden und Zusammenbauen einer funktionellen Immunoglobulin-Untereinheit. Somit umfaßt der Nichtprimaten-Säugetierwirt mindestens eine xenogene konstante Region oder ein Protein davon, die zu einem Spleißvorgang unter Bildung einer funktionellen J-Region eines endogenen oder exogenen Immunoglobulin-Locus befähigt ist, oder er kann einen gesamten Immunoglobulin-Locus des Wirts unter Substitution durch einen teilweisen oder vollständigen xenogenen Immunoglobulin-Locus aufweisen oder kann einen xenogenen Immunoglobulin-Locus, der in ein Chromosom der Wirtszelle inseriert ist, und eine inaktivierte endogene Immunoglobulin-Region aufweisen. Diese verschiedenen Alternativen werden zumindest teilweise erreicht, indem man sich einer homologen Rekombination an den Immunoglobulin-Loci für die schweren und leichten Ketten bedient.

Beschreibung von speziellen Ausführungsformen

Es werden neue, transgene Säugetierwirte, die von Primaten und insbesondere vom Menschen abweichen, bereitgestellt, wobei der Wirt befähigt ist, eine Immunantwort gegen ein Immunogen aufzubauen, wobei die Antwort

konstante und/oder variable Regionen von Primaten, insbesondere vom Menschen, oder andere derartige Effektor-Peptidsequenzen von Interesse bildet. Die Wirte sind dadurch charakterisiert, daß sie infolge einer Substitution und/oder Inaktivierung der für die endogene Immunoglobulin-Untereinheit kodierenden Loci zur Bildung von xenogenen oder modifizierten Antikörpern befähigt sind. Die Modifikationen behalten zumindest einen Bereich der konstanten Regionen, der für den Aufbau der Bindungsstelle der variablen Region, die am C-Terminus an ein funktionelles Peptid gebunden ist, sorgt. Das funktionelle Peptid kann zahlreiche Formen oder Konformationen annehmen und als ein Enzym, Wachstumsfaktor, Bindungsprotein, Ligand, Cytokin, Effektorprotein, chelatbildendes Protein und dergl. dienen. Bei den Antikörpern kann es sich um beliebige Isotypen handeln, wie IgA, D, E, G oder M oder Untertypen innerhalb des Isotyps.

Zum Erhalt der gewünschten transgenen Wirte können zahlreiche Strategien angewandt werden. Verschiedene transgene Wirte können eingesetzt werden, insbesondere Mäuse, hasenartige Wirte, Schafe, Schweine, Pferde, Hunde, Katzen oder dergl., d.h. normalerweise von Primaten abweichende Wirte. Großenteils wurden für die Erzeugung von B-Lymphozyten zur Immortalisierung für die Erzeugung von Antikörpern Mäuse herangezogen. Da Mäuse leicht handzuhaben sind, in großen Mengen bereitgestellt werden können und für ihr umfangreiches Immunrepertoire bekannt sind, stellen sie üblicherweise die Tiere der Wahl dar. Daher bezieht sich die nachstehende Erörterung auf Mäuse, es ist jedoch darauf hinzuweisen, daß auch andere Tiere, insbesondere Nichtprimaten-Säugetiere ohne weiteres anstelle der Mäuse eingesetzt werden können, wobei man sich der gleichen Verfahrensweisen bedient.

Bei einer Strategie werden als individuelle Stufen die humanen schwere und leichte Ketten-Immunoglobulin-Genkomplexe in die Mäuse-Keimbahn eingeführt und in einer getrennten Stufe werden die entsprechenden Mäusegene nicht-funktionell gemacht. Humane schwere und leichte Ketten-Gene werden in einem entsprechenden eukaryontischen oder prokaryontischen Mikroorganismus rekonstruiert, und die erhaltenen DNA-Fragmente lassen sich in Pronuclei von befruchteten Mäuse-Oozyten oder embryonalen Stammzellen einführen. Die Inaktivierung der endogenen Mäuse-Immunoglobulin-Loci wird durch gezieltes Aufbrechen der entsprechenden Loci durch homologe Rekombination in embryonalen Mäuse-Stammzellen erreicht. In jedem Fall werden chimäre Tiere erzeugt, die sich teilweise von den modifizierten embryonalen Stammzellen ableiten und zur Übertragung der genetischen

Modifikationen durch die Keimbahn befähigt sind. Die Verbindung von Mäusstämmen mit humanen Immunoglobulin-Loci unter Bildung von Stämmen mit inaktivierten Mäuse-Loci führt zu Tieren, deren Antikörpererzeugung rein human ist.

Diese Strategien beruhen auf der bekannten Organisation der Immunoglobulin-Ketten-Loci in einer Anzahl von Tieren, da die Organisation, die relative Stellung der für die einzelnen Domänen kodierenden Exons und die Stellung von Spleißstellen und transkriptionalen Elementen in unterschiedlichem Ausmaß bekannt sind. Beim Menschen befindet sich der Locus für die schwere Immunoglobulin-Kette am Chromosom 14. In der 5'-3'-Richtung der Transkription umfaßt der Locus einen großen Cluster von Genen der variablen Region (V_H), den Genen der Diversitätsregion (D), gefolgt von den Genen der Verbindungsregion (J_H) und dem konstanten Gencluster (C_H). Die Größe des Locus wird auf etwa 2500 Kilobasen (kb) geschätzt. Während der Entwicklung von B-Zellen werden diskontinuierliche Gensegmente aus dem Keimbahn-IgH-Locus mittels einer physikalischen Umordnung der DNA nebeneinander angeordnet. Um ein funktionelles schwere Ketten-Ig-Polypeptid zu bilden, müssen drei diskontinuierliche DNA-Segmente aus den V_H -, D- und J_H -Regionen in einer speziellen sequentiellen Anordnung verbunden werden: V_H an DJ_H unter Bildung der funktionellen Einheit V_HDJ_H . Nachdem V_HDJ_H gebildet worden ist, werden spezielle schwere Ketten erzeugt unter anschließender Transkription des Ig-Locus, wobei als Matrize die spezifische $V_HDJ_HC_H$ -Einheit mit einem Gehalt an Exons und Introns herangezogen wird. Es gibt zwei Loci für Ig-leichte Ketten, den κ -Locus am humanen Chromosom 2 und den λ -Locus am humanen Chromosom 22. Die Struktur der IgL-Loci ist ähnlich der des IgH-Locus, mit der Ausnahme, daß die D-Region nicht vorhanden ist. Im Anschluß an die IgH-Umlagerung wird die Umlagerung eines leichten Ketten-Locus in ähnlicher Weise durch V_L - und J_L -Verbindung der κ - oder λ -Kette erreicht. Die Größen der λ - und κ -Loci betragen jeweils annähernd 1000 kb. Die Expression von umgelagertem IgH und einer Ig κ - oder Ig λ -leichten Kette in einer speziellen B-Zelle erlaubt die Erzeugung von Antikörpermolekülen.

Um den IgH_{hu}-Locus zu isolieren, zu klonen und zu übertragen kann ein künstliches Hefe-Chromosom verwendet werden. Der gesamte IgH_{hu}-Locus kann in einem oder einigen künstlichen Hefe-Chromosom (YAC)-Klonen enthalten sein. Das gleiche gilt für die Ig-leichte Ketten-Loci. Die anschließende Einführung der entsprechenden schwere Ketten- oder leichte Ketten-YAC-Klone in Empfängerhefe berücksichtigt die Rekonstitution von

intakten Keimbahn-Ig-Loci durch homologe Rekombination zwischen überlappenden Homologieregionen. Auf diese Weise läßt sich die Isolierung von DNA-Fragmenten, die für die humane Ig-Kette kodieren, erreichen.

Um ein breites Spektrum von Antikörpern von hoher Affinität zu erhalten, ist es nicht erforderlich, daß man die gesamte V-Region einschließt. Verschiedene V-Region-Genfamilien sind innerhalb des V-Region-Clusters eingestreut. Somit kann durch Bereitstellung einer Untergruppe (Subset) der bekannten V-Region-Gene der humanen schwere und leichte Ketten-Ig-Loci (Berman et al., EMBO J., Bd. 7 (1988), S. 727-738) anstelle des gesamten Komplements von V-Regionen der transgene Wirt immunisiert werden und zum Aufbau einer starken Immunantwort zur Bereitstellung von Antikörpern von hoher Affinität befähigt werden. Auf diese Weise können relativ kleine DNA-Fragmente des Chromosoms eingesetzt werden, beispielsweise ist in Fig. 1b dieser Druckschrift ein Fragment mit angeblich 670 kb des Ig_{Hu}-Locus dargestellt. Dieses NotI-NotI-Restriktionsfragment könnte zur Bereitstellung von verschiedenen V-Regionen dienen, was zu einer erhöhten Diversität durch Rekombination mit verschiedenen D- und J-Regionen und durch Ablauf einer somatischen Mutation führen würde.

Um für die Erzeugung von humanen Antikörpern in einem xenogenen Wirt zu sorgen, ist es erforderlich, daß der Wirt zur Bereitstellung der notwendigen Enzyme und anderer Faktoren, die an der Bildung von Antikörpern beteiligt sind, kompetent ist, während kompetente endogene Gene zur Expression von schweren und leichten Untereinheiten von Immunoglobulinen fehlen. Somit sind diese Enzyme und andere Faktoren, die mit der Keimbahn-Umlagerung, dem Spleißen, der somatischen Mutation und dergl. assoziiert sind, im xenogenen Wirt funktionell. Was fehlt, ist eine funktionelle natürliche Region, die die verschiedenen Exons, die mit der Bildung von endogenen Immunoglobulin-Untereinheiten assoziiert sind, enthält.

Die humane DNA kann in die Pronuclei von befruchteten Oozyten oder embryonalen Stammzellen eingeführt werden. Die Integration kann willkürlich oder homolog sein, je nach der speziellen angewandten Strategie. Somit kann man unter Anwendung von Transformation, unter Anwendung von repetitiven Stufen oder in Kombination mit Züchtungsmaßnahmen transgene Tiere erhalten, die zur Bildung von humanen Antikörpern im wesentlichen in Abwesenheit von leichten oder schweren Wirts-Immunoglobulin-Untereinheiten befähigt sind.

Um die Wirts-Immunoglobulin-Loci zu inaktivieren, kann man sich einer homologen Rekombination bedienen, wobei DNA an den Immunoglobulin-

Loci von schweren Ketten und leichten Ketten eingeführt wird, was die Bildung von endogenen Immunoglobulin-Untereinheiten hemmt. Da zwei schwere Ketten-Allelen und zwei leichte Ketten-Loci jeweils mit zwei Allelen vorhanden sind, kann man zwar die Wahl treffen, die λ -Loci zu ignorieren, es müssen aber mehrfache Transformationen durchgeführt werden, die zur Inaktivierung von sämtlichen Allelen führen. (Unter Transformation ist eine beliebige Technik zur Einführung von DNA in eine lebensfähige Zelle zu verstehen, wie Konjugation, Transformation, Transfektion, Transduktion, Elektroporation, Lipofektion, "Biolistics" oder dergl.) Eine homologe Rekombination kann angewandt werden, um die einzelnen Loci funktionell zu inaktivieren, wobei man die homologe DNA in embryonale Stammzellen einführt, wonach sich die Einführung der modifizierten Zellen in Empfänger-Blastocysten anschließt. Die anschließende Züchtung ermöglicht die Keimbahn-Transmission des inaktivierten Locus. Man kann daher sich für die Züchtung von heterozygotischen Nachkommen entscheiden und homozygotische Nachkommen der heterozygotischen Eltern auswählen oder man kann erneut die embryonale Stammzelle für die homologe Rekombination und Inaktivierung des vergleichbaren Locus verwenden.

Obgleich die Anzahl der Transformationsstufen durch Bereitstellung von mindestens einem Fragment des humanen Immunoglobulin-Untereinheit-Locus für die homologe Rekombination mit dem analogen endogenen Immunoglobulin verringert werden kann, kann in dem Fall, daß nur eine Transformation angewandt wird und der humane Locus in das Wirtsgenom in willkürlicher Weise integriert wird, eine Gesamtzahl von 8 Transformationen erforderlich sein.

Zur Inaktivierung kann eine beliebige Läsion im Ziel-Locus, die zu einer Verhinderung der Expression einer Immunoglobulin-Untereinheit dieses Locus führt, herangezogen werden. Somit besteht der wichtige Faktor darin, daß die Ig-Keimbahn-Genumlagerung gehemmt wird oder eine funktionelle Botschaft zur Kodierung der Immunoglobulin-Untereinheit nicht gebildet werden kann, und zwar aufgrund eines Versagens der Transkription, eines Versagens der Verarbeitung der Botschaft oder dergl.

Zur Inaktivierung des Immunoglobulin-schwere Ketten-Untereinheit-Locus wird die Läsion in die J-Region des schwere Ketten-Immunoglobulin-Untereinheit-Locus eingeführt. Somit bildet man ein Konstrukt, dem eine funktionelle J-Region fehlt und das die Sequenzen neben der J-Region und flußaufwärts und/oder flußabwärts von der J-Region umfaßt oder die gesamte Region oder einen Teil davon mit einer inaktivierenden Insertion in

der J-Region enthält. Die Insertion kann 50 bp oder mehr umfassen, wobei eine derartige Insertion zum Aufbrechen der Formation einer funktionellen mRNA führt. Wünschenswerterweise wird die J-Region insgesamt oder teilweise, üblicherweise zu mindestens etwa 75% des Locus und vorzugsweise mindestens etwa 90% des Locus, deletiert. Gegebenenfalls kann sich die Läsion zwischen den beiden flankierenden Sequenzen, die die homologe Region begrenzt, über die J-Region hinaus in die variable Region und/oder in die konstante Region erstrecken. In der leichten Kette können J-, V- oder C-Regionen oder Verstärkerregionen vorliegen.

Wünschenswerterweise wird ein Marker-Gen zum Ersatz der J-Region verwendet. Es können verschiedene Marker verwendet werden, insbesondere solche, die eine positive Selektion ermöglichen. Von besonderem Interesse ist der Einsatz einer G418-Resistenz, die sich aus der Expression des Gens für Neomycin-Phosphotransferase ergibt.

Flußaufwärts und/oder flußabwärts vom Ziel-Gen-Konstrukt kann ein Gen vorliegen, das für eine Identifizierung des Auftretens eines doppelten Crossovers sorgt. Für diesen Zweck kann Herpes simplex-Virus-Thymidin-kinase herangezogen werden, da Zellen, die das Thymidin-kinase-Gen exprimieren, unter Verwendung von Nucleosid-Analogen, wie Acyclovir oder Gancyclovir aufgrund von deren zytotoxischen Wirkungen auf Zellen, die ein funktionelles HSV-tk-Gen enthalten, abgetötet werden können. Das Fehlen einer Empfindlichkeit auf diese Nucleosid-Analogen zeigt die Abwesenheit des HSV-Thymidin-kinase-Gens und zeigt daher, daß da, wo eine homologe Rekombination stattgefunden hat, auch ein doppeltes Crossover erfolgt ist.

Obgleich das Vorliegen des Marker-Gens im Genom zeigt, daß eine Integration erfolgt ist, ist es immer noch erforderlich, festzustellen, ob eine homologe Integration stattgefunden hat. Dies kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden. Meistens wird die DNA-Analyse herangezogen, um die Stellung der Integration festzustellen. Durch Verwendung von Sonden für das Insert und die anschließende Sequenzierung der 5'- und 3'-Regionen, die das Insert flankieren, auf die Anwesenheit des Ziel-Locus, der sich über die flankierende Region des Konstrukts hinaus erstreckt, oder durch Identifizierung des Vorliegens einer Deletion, wenn eine derartige Deletion eingeführt worden ist, kann die gewünschte Integration festgestellt werden.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann vorteilhafterweise zum Nachweis des Vorliegens einer homologen Rekombination herangezogen wer-

den. Es können Sonden eingesetzt werden, die komplementär mit einer Sequenz innerhalb des Konstrukts und komplementär mit einer Sequenz außerhalb des Konstrukts und am Ziel-Locus sind. Auf diese Weise kann man nur dann DNA-Ketten, bei denen beide Primer in den komplementären Ketten vorhanden sind, erhalten, wenn eine homologe Rekombination stattgefunden hat. Durch Nachweis des Vorliegens der Sonden für die Sequenz von erwarteter Größe wird das Vorliegen einer homologen Rekombination gestützt.

Das Konstrukt kann ferner ein Replikationssystem umfassen, das in der Nichtprimaten-Säugetierwirtszelle funktionell ist. Meistens beinhalten diese Replikationssysteme virale Replikationssysteme, wie Simian Virus 40, Epstein-Barr-Virus, Polyoma-Virus, Papilloma-Virus und dergl. Verschiedene transkriptionelle Initiationssysteme können herangezogen werden, entweder von Viren oder von Säugetiergenen, wie SV40, Metallathionein-I und -II-Gene, β -Actin-Gen, Adenovirus-frühe und späte Gene, Phosphoglycerat-kinase-Gen, RNA-Polymerase II-Gen oder dergl. Zusätzlich zu Promotoren können Wildtyp-Verstärker herangezogen werden, um die Expression des Marker-Gens zu verstärken.

Bei der Konstruktion der Konstrukte für die homologe Rekombination kann ein Replikationssystem für Prokaryonten, insbesondere E. coli, zur Herstellung des Konstrukts eingesetzt werden, wobei man nach jeder Manipulation kloniert, eine Analyse, beispielsweise eine Restriktionskartierung oder Sequenzierung, eine Erweiterung und Isolierung der gewünschten Sequenz vornimmt. Wenn das Konstrukt groß ist, im allgemeinen mehr als etwa 50 kbp, üblicherweise mehr als 100 kbp und im allgemeinen nicht mehr als etwa 1000 kbp, kann ein künstliches Hefe-Chromosom (YAC) zum Klonieren des Konstrukts verwendet werden.

Nachdem ein Konstrukt hergestellt worden ist und etwaige unerwünschte Sequenzen, z. B. prokaryontische Sequenzen, entfernt worden sind, kann das Konstrukt nunmehr in die Zielzelle eingeführt werden. Beliebige zweckmäßige Techniken zum Einführen der DNA in die Zielzellen können eingesetzt werden. Zu den Techniken gehören die Sphäroplastenfusion, Lipofektion, Elektroporation, durch Calciumphosphat vermittelte DNA-Übertragung oder direkte Mikroinjektion. Nach Transformation oder Transfektion der Zielzellen können die Zielzellen durch positive und/oder negative Marker, wie vorstehend angegeben, Neomycin-Resistenz und Acyclovir- oder Gancyclovir-Resistenz, ausgewählt werden. Zellen, die den gewünschten Phänotyp zeigen, können sodann weiter durch Restriktionsanalyse, Elektrophorese, Southern-Analyse, PCR oder dergl. analysiert wer-

den. Durch Identifizierung von Fragmenten, die die Anwesenheit der Läsion(en) am Ziel-Locus zeigen, kann man Zellen identifizieren, in denen eine homologe Rekombination unter Inaktivierung einer Kopie des Ziel-Locus stattgefunden hat.

Das vorstehend beschriebene Verfahren kann zunächst mit einem schweren Ketten-Locus in einer embryonalen Stammzelle unter anschließender Reifung der Zellen zur Bereitstellung eines reifen fruchtbaren Wirts bereitgestellt werden. Anschließend kann durch Züchten der heterozygotischen Wirte ein homozygotischer Wirt erhalten werden oder es lassen sich embryonale Stammzellen isolieren und transformieren, um den zweiten IgH-Locus zu inaktivieren. Das Verfahren wird wiederholt, bis sämtliche erwünschten Loci inaktiviert worden sind. Alternativ kann zunächst der leichte Ketten-Locus behandelt werden. In jedem Stadium können die humanen Loci eingeführt werden.

Wie bereits erwähnt, kann der Ziel-Locus durch den analogen humanen Locus ersetzt werden. Auf diese Weise kann der humane Locus im wesentlichen in die gleiche Region wie der analoge Wirts-Locus gebracht werden, so daß eine mit der Position des Locus assoziierte etwaige Regulation im wesentlichen für den humanen Immunglobulin-Locus die gleiche ist. Beispielsweise kann man durch Isolieren des gesamten V_H -Gen-Locus (unter Einschluß der V-, D- und J-Sequenzen) oder eines Teils davon und durch Flankieren des humanen Locus mit Sequenzen aus dem Mäuse-Locus, vorzugsweise mit Sequenzen, die durch mindestens etwa 5 kbp im Wirtslocus und vorzugsweise durch mindestens etwa 10 kbp im Wirtslocus getrennt sind, das humane Fragment in diese Region in einem oder mehreren Rekombinationsereignissen inserieren, wobei man die variable Region des Wirt-Immunglobulin-Locus durch den humanen Immunglobulin-Locus ersetzt. Auf diese Weise kann man die Fähigkeit des Wirts zur Bildung einer endogenen Immunglobulin-Untereinheit zerstören, während man es dem Promotor des humanen Immunglobulin-Locus ermöglicht, durch den Wirts-Verstärker aktiviert und durch das Regulationssystem des Wirts reguliert zu werden.

Nachdem die humanen Loci in das Wirtsgenom entweder durch homologe Rekombination oder durch willkürliche Integration eingeführt worden sind und Wirtstiere mit den inaktivierten endogenen Immunglobulin-Loci gebildet worden sind, indem man in entsprechender Weise verschiedene transgene oder mutierte Tiere gezüchtet hat, kann man einen Wirt erzeugen, dem die native Fähigkeit zur Bildung der endogenen Immunglobulin-Untereinheiten

fehlt, der jedoch die Fähigkeit besitzt, humane Immunoglobuline mit einem mindestens signifikanten Bereich des humanen Repertoires zu erzeugen.

Die funktionelle Inaktivierung der beiden Kopien von jedem der drei Wirts-Ig-Loci, wobei der Wirt den humanen IgH-Locus und die humanen Ig κ - und/oder λ -Loci enthält, ermöglicht die Bildung von rein humanen Antikörper-Molekülen ohne Bildung von Wirts-Antikörpern oder chimären Wirts/Mensch-Antikörpern. Ein derartiger Wirtsstamm reagiert durch Immunisierung mit spezifischen Antigenen unter Bildung von Mäuse B-Zellen, die spezifische humane Antikörper erzeugen, wobei die B-Zellen mit Mäuse-Myelomzellen fusioniert oder auf eine beliebige andere Weise zur kontinuierlichen stabilen Bildung von humanen monoklonalen Antikörpern immortalisiert werden können.

Die vorliegenden Methoden und Strategien müssen nicht auf die Erzeugung von vollständigen Immunoglobulinen beschränkt bleiben, sondern bieten auch die Möglichkeit, Regionen, die mit einem Teil der konstanten Region verbunden sind, bereitzustellen, z. B. CH_1 , CH_2 , CH_3 oder CH_4 oder eine Kombination davon. Alternativ können ein oder mehr Exons der C_H - und C_k - oder $C\lambda$ -Regionen durch eine für ein unterschiedliches Protein kodierende Sequenz ersetzt oder mit dieser verbunden werden, z. B. mit einem Enzym, wie Plasminogen-Aktivator, Superoxid-dismutase und dergl.; mit einer Toxin A-Kette, wie Ricin, Abrin, Diphtherie-Toxin und dergl.; Wachstumsfaktoren; zytotoxischen Mitteln, wie TNF oder dergl. Diesbezüglich wird beispielsweise auf WO 89/07142, WO 89/09344 und WO 88/03559 verwiesen. Durch Inserieren des in Frage stehenden Proteins in ein Exon einer konstanten Region und durch Gewährleisten des Spleißens der variablen Region an das Exon der modifizierten konstanten Region kann das erhaltene Bindungsprotein eine vom Immunoglobulin unterschiedliche C-terminale Region aufweisen. Durch Bereitstellen einer Stopp-Sequenz mit dem inserierten Gen weist das Proteinprodukt das inserierte Protein als C-endständige Region auf. Gegebenenfalls kann die konstante Region vollständig durch das andere Protein substituiert werden, beispielsweise indem man ein Konstrukt mit entsprechenden Spleißstellen zur Verbindung der variablen Region mit dem anderen Protein bereitstellt.

Die Antikörper oder Antikörperanaloge bildenden B-Zellen aus dem transgenen Wirt können zur Fusion mit einer Mäuse-Myeloidzelle unter Bildung von Hybridomen verwendet oder durch ein anderes herkömmliches Verfahren, z. B. durch Transfektion mit Onkogenen, immortalisiert werden. Diese immortalisierten Zellen können sodann in einer kontinuierlichen

Kultur gezüchtet oder in das Peritoneum eines kompatiblen Wirts zur Bildung von Aszites eingeführt werden.

Die vorliegende Erfindung gewährleistet die Erzeugung eines polyklonalen humanen Antiserums oder von humanen monoklonalen Antikörpern oder Antikörperanalogen. Wenn der Nichtprimaten-Säugetierwirt mit einem Immunogen immunisiert worden ist, können die erhaltenen humanen Antikörper von den übrigen Proteinen unter Verwendung einer Affinitätssäule mit einem Fc-bindenden Rest, wie Protein A oder dergl., isoliert werden.

Zur Erzeugung von Tieren aus embryonalen Stammzellen können die Zellen nach Transformation auf einer Züchtungsschicht in einem geeigneten Medium, z. B. mit DMEM versetztem fötalem Kälberserum, ausgestrichen werden. Zellen, die das Konstrukt enthalten, können unter Verwendung eines selektiven Mediums nachgewiesen werden. Nach einer für das Kolonienwachstum ausreichenden Zeitspanne können Kolonien ausgewählt und auf das Auftreten einer Integration oder homologen Rekombination analysiert werden. Wie vorstehend beschrieben, kann PCR mit Primern innerhalb oder ohne die Konstruktsequenz, jedoch am Ziel-Locus herangezogen werden.

Kolonien, die eine homologe Rekombination zeigen, können sodann für die Embryo-Manipulation oder Blastocysten-Injektion herangezogen werden. Blastocysten lassen sich aus weiblichen Tieren durch Spülen des Uterus 3 bis 5 Tage nach der Ovulation erhalten. Die embryonalen Stammzellen können sodann trypsiniert werden, und die modifizierten Zellen können mit einem Tröpfchen mit einem Gehalt an der Blastocyste versetzt werden. Mindestens eine und bis zu 30 modifizierte embryonale Stammzellen können in das Blastozöl der Blastocyste injiziert werden. Nach Injektion werden mindestens eine und nicht mehr als etwa 15 der Blastocysten jeweils in das Uterushorn von pseudoträchtigen weiblichen Tieren zurückgeführt. Nach dem Austragen werden die geworfenen Jungen einem Screening auf mutante Zellen mit dem Konstrukt unterworfen.

Bei den Säugetieren kann es sich um nicht-humane, insbesondere um Nichtprimaten-Säugetiere handeln, wie Labortiere, insbesondere kleine Labortiere, wie Mäuse, Ratten, Meerschweinchen und dergl., sowie um Haustiere, Stubentiere und dergl.

Die folgenden Beispiele dienen der nicht-beschränkenden Erläuterung der Erfindung.

Experimenteller Teil

Inaktivierung der schwere Ketten-J-Gene von Mäusen

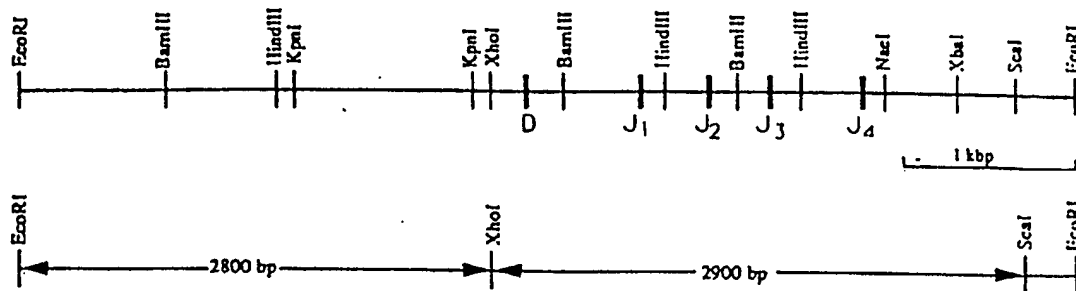
Konstruktion des Inaktivierungsvektors

Ein 6,4 kb-EcoRI-Fragment mit einem Gehalt an den schwere Ketten-J-Genen von Mäusen und den flankierenden Sequenzen wird aus einer BALB/c-Mäuseembryo-Genombibliothek unter Verwendung der von Sakano et al., Nature, Bd. 290 (1981), S. 562-565 beschriebenen Sonden geklont. Dieses Fragment (mDJ) wird in EcoRI-verdautes pUC19-Plasmid (pmDJ) inseriert. Ein 2,9 kb-Fragment mit einem Gehalt an den 4 J-Genen wird durch XhoI-ScaI-Verdau deletiert (pmD δ JNeo, vgl. Diagramm 1). Ein 1150 bp-XhoI-BamHI-Fragment mit einem Gehalt an einem Neomycin-Resistenzgen unter Steuerung durch den Herpes simplex-Virus-Thymidin-kinase-Gen (HSV-tk)-Promotor und mit einem Polyom-Verstärker wird aus pMC1Neo (Thomas und Capocchi, Cell, Bd. 51 (1987), S. 503-512) isoliert. Ein synthetischer Adaptor wird an dieses Fragment addiert, um das BamHI-Ende in ein ScaI-Ende überzuführen. Das erhaltene Fragment wird mit XhoI-ScaI-pmD δ J verbunden, um den Inaktivierungsvektor (pmD δ J.Neo) zu bilden, bei dem die 5'- zu 3'-Orientierung des Neomycins und der schwere Ketten-Promotoren identisch ist. Dieses Plasmid wird durch NdeI-Verdau vor Transfektion in ES-Zellen linearisiert. Die das homologe Rekombinationseignis steuernden Sequenzen sind die 3 kb- und 0,5 kb-Fragmente, die sich auf der 5'- bzw. 3'-Seite des Neomycin-Gens befinden.

Diagramm 1

Mäuse-schwere Ketten-J-Gene-Inaktivierungsvektor

(A) Target-Mäuse-schwere Ketten-J-Gene



(B) Inaktivierungsvektor mDAJ.Neo



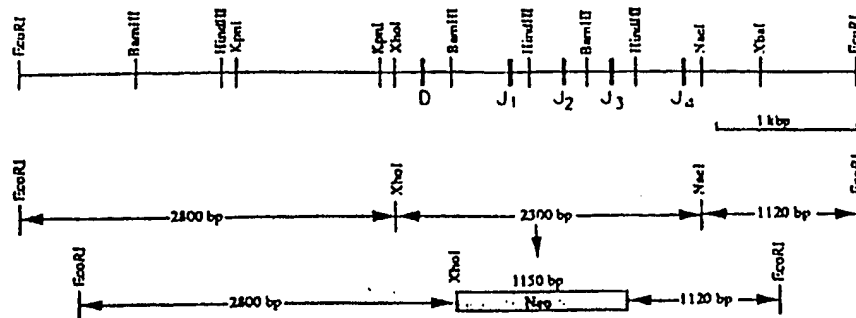
Die ES-Zelllinie E14TG2a (Hooper et al., Nature, Bd. 326 (1987) S. 292-295) wird auf mit Mitomycin behandelten primären embryonalen Fibroblasten-Züchtungsschichten im wesentlichen gemäß den Angaben von Doetschman et al., J. Embryol. Exp. Morphol., Bd. 87 (1985), S. 27-45, gezüchtet. Die embryonalen Fibroblasten werden aus Embryos von weiblichen C57Bl/6-Tieren, die 14 bis 17 Tage vorher mit einem männlichen Homozygoten für ein Neomycin-Transgen gepaart worden waren (Gossler et al., PNAS, Bd. 83 (1986), S. 9065-9069), hergestellt. Diese Zellen sind zum Wachstum in Medium mit einem Gehalt an G418 befähigt. Die Bedingungen der Elektroporation sind bei Boggs et al., Ex. Hematol. (NY), Bd. 149 (1986), S. 988-994, beschrieben. ES-Zellen werden trypsiniert, in Kulturmedien in einer Konzentration von 4×10^7 /ml resuspendiert und in Gegenwart der Ziel-DNA in einer Konzentration von 12 nM im ersten Experiment und von 5 nM

DNA im zweiten Experiment der Elektroporation unterworfen. Eine Spannung von 300 V bei einer Kapazität von 150-250 μF erweist sich als optimal bei einer Elektroporationszelle von 5 mm Länge und 100 mm^2 Querschnitt. 5×10^6 durch Elektroporation erhaltene Zellen werden in 100 mm-Schalen auf mit Mitomycin behandelte Fibroblasten in Gegenwart von Dulbecco-modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) unter Supplementierung mit 15% fötalem Kälberserum (FBS) und 0,1 mM 2-Mercaptoethanol ausgestrichen. Die Medien werden 24 h nach der Elektroporation durch Medien mit einem Gehalt an 200 $\mu\text{g/ml}$ G418 ersetzt.

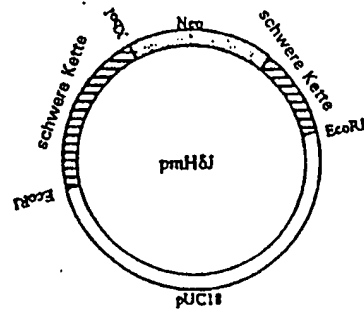
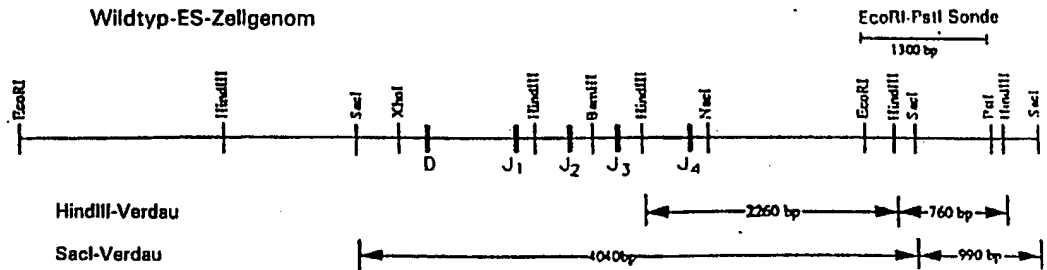
10-14 Tage nach der Elektroporation erhaltene ES-Kolonien werden mit Kapillarpipetten zur Analyse durch PCR entnommen. Die Hälfte der einzelnen entnommenen Kolonien wird in Platten mit 24 Vertiefungen, die bereits mit Mitomycin-behandelten-Feeder-Zellen beimpft sind, aufbewahrt. Die restlichen Hälften werden in Pools von 3-4 vereinigt, auf Eppendorf-Röhrchen mit einem Gehalt an etwa 0,5 ml PBS übertragen und durch PCR auf homologe Rekombination analysiert. Die Bedingungen für die PCR-Reaktionen entsprechen im wesentlichen den Angaben von Kim und Smithies, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 16 (1988), S. 8887-8893. Nach Pelletisieren werden die ES-Zellen in 5 μl PBS resuspendiert und durch Zugabe von 55 μl H_2O zu den einzelnen Röhrchen lysiert. DNAsen werden durch 10-minütiges Erwärmen der einzelnen Röhrchen auf 95°C inaktiviert. Nach 30-minütiger Behandlung mit Proteinase K bei 55°C werden jeweils 30 μl Lysat in ein Röhrchen mit einem Gehalt an 20 μl eines Reaktionsgemisches mit einem Gehalt an PCR-Puffer, jeweils 1,5 μg Primer, 3U Taq-Polymerase, 10% DMSO und dNTPs in einer Konzentration von jeweils 0,2 mM übertragen. Die PCR-Erweiterung wendet 55 Zyklen unter Einsatz eines Thermozyklogeräts mit einer Schmelzdauer von 65 Sekunden bei 92°C und einer Anelie- und Erweiterungszeit von 10 Minuten bei 65°C an. Bei den beiden Primer-Oligonucleotiden handelt es sich um TGGCGGACCGCTATCCCCAGGAC und TAGCCTGGGTCCCTCCTTAC, die einer Region von 650 Basen auf der 3'-Seite des Startcodons des Neomycin-Gens und den im schwere Ketten-Gen der Maus liegenden Sequenzen bzw. 1100 Basen auf der 3'-Seite der Insertionsstelle entsprechen. 20 μl des Reaktionsgemisches werden der Elektrophorese an Agarosegelen unterworfen und auf Nylon-Membranen (Zeta Bind) übertragen. Filter werden mit einem ^{32}P -markierten Fragment des 991 bp-XbaI-Fragments der J-C-Region geprüft.

Diagramm 2

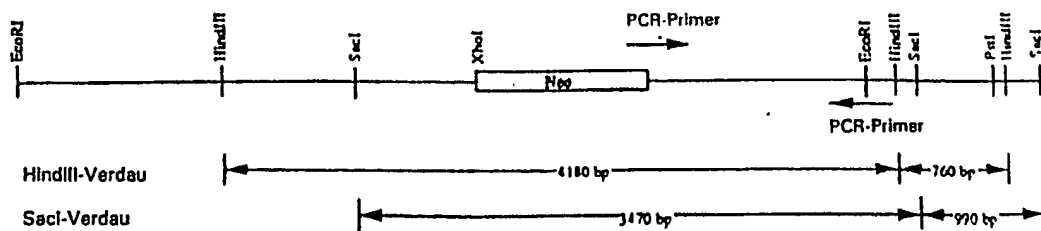
(A) Target-Mäuse-schwere Ketten-J-Gene



(B) Inaktivierungsvektor pmHδJ

(C) Southern-Analyse von pmHδJ-Target-ES-Kolonien
Wildtyp-ES-Zellgenom

Target-ES-Zellgenom



Inaktivierung der Mäuse-Ig-schwere Ketten-J-Gene in ES-Zellen

Konstruktion des Inaktivierungsvektors

Ein 6,1 kb-EcoRI-Fragment mit einem Gehalt an den Mäuse-Immunoglobulin-schwere Ketten-J-Region-Genen und flankierenden Sequenzen, wurde nach Klonierung aus einer Balb/c-Mäuse-Embryogenom-Bibliothek und nach Insertion in pUC18 (pJH) mit XhoI und NaeI verdaut, um ein Fragment von etwa 2,3 kbp mit einem Gehalt an den 4 J-Genen zu deletieren (vgl. Diagramm 2A). Ein XhoI-BamHI-Fragment von etwa 1,1 kbp, das an der BamHI-Stelle abgestumpft war und ein durch den Herpes simplex-Virus-Thymidin-kinase-Gen (HSV-tk)-Promotor und Polyom-Verstärker gesteuertes Neomycin-Resistenz-Gen enthielt, wurde aus pMC1Neo (Thomas und Capecchi, Cell, Bd. 51 (1987), S. 503-512) isoliert. Dieses Fragment wurde in XhoI-NaeI-deletiertes pJH inseriert, um den Inaktivierungsvektor (PmH5J; vgl. Diagramm 2B) zu bilden, in dem die transkriptionelle Orientierung der Neomycin- und schwere Ketten-Gene die gleiche war. Dieses Plasmid wurde vor Transfektion in ES-Zellen durch NdeI-Verdau linearisiert. Bei den das homologe Rekombinationsereignis steuernden Sequenzen handelt es sich um etwa 2,8 kbp- bzw. etwa 1,1 kbp-Fragmente in der 5'- bzw. 3'-Stellung zum Neomycin-Gen.

Züchtung, Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Die ES-Zelllinie E14TG2a (Koller und Smithies, PNAS, USA, Bd. 86 (1989), S. 8932-8935) wurde auf mit Mitomycin C behandelten embryonalen Fibroblasten-Nährschichten gemäß den dort gemachten Angaben gezüchtet. ES-Zellen wurden trypsiniert, in HBS-Puffer (pH-Wert 7,05, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0,7 mM Na₂HPO₄, 21 mM HEPES pH-Wert 7,1) in einer Konzentration von 2×10^7 /ml resuspendiert und in Gegenwart von 50 µg/ml des linearisierten Inaktivierungsvektors der Elektroporation unterworfen. Die Elektroporation wurde mit einem BioRad Gene Pulser unter Anwendung von 240 Volt und 500 µF Kapazität durchgeföhrt. 5×10^6 der Elektroporation unterworfenen Zellen wurden auf mit Mitomycin C behandelten Fibroblasten in 100 mm-Schalen in Gegenwart von Dulbecco-modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), das mit 15% fötalem Kälberserum und 0,1 mM 2-Mercaptoethanol supplementiert war, ausgestrichen. Das Medium wurde nach 24-stündiger Elektroporation durch ein Medium mit einem Gehalt an 200 µg/ml G418 ersetzt. G418-resistente ES-Kolonien, die nach 12- bis 14-tägiger Elektroporation erhalten worden waren, wurden mit Kapillarpipetten zur Analyse unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entnommen. Jeweils die Hälfte der entnommenen Kolonien wurde auf eine einzelne Vertiefung

einer Platte mit 24 Vertiefungen, die vorher mit Mitomycin C-behandelten Feeder-Zellen angeimpft waren, übertragen. Die zweite Hälfte wurde jeweils 4-fach gepoolt, in Eppendorf-Röhrchen mit einem Gehalt an 0,3 ml PBS übertragen, und Zell-Lysate wurden für die PCR-Analyse gemäß den Angaben von Joyner et al., (Nature, Bd. 338 (1989), S. 153-155) hergestellt. Die PCR-Reaktion umfaßte 5-20 µl des Zell-Lysats, jeweils 1 µM Primer, 1,5 u Taq-Polymerase und 200 µM dNTPs. Zur PCR-Amplifikation wurden 45 Zyklen unter Verwendung eines thermischen Zyklusgeräts (Perkin-Elmer Cetus) mit einer 1-minütigen Schmelzdauer bei 94°C, einer 2-minütigen Annelierungsdauer bei 55°C und einer 3-minütigen Erweiterungsdauer bei 72°C durchgeführt. Bei den beiden Primer-Oligonucleotiden handelte es sich um ACGGTATCGCCGCTCCCGAT und AGTCACTGTAAAGACTTCGGGTA, die etwa 120 Basen auf der 5'-Seite der BamHI-Stelle des Neomycin-Gens und den Sequenzen im Mäuse-schwere Ketten-Gen bzw. etwa 160 Basen auf der 3'-Seite der Insertionsstelle entsprechen. Eine erfolgreiche homologe Rekombination ergibt ein Fragment von etwa 1,4 kbp. 20 µl des Reaktionsgemisches wurden der Elektrophorese an 1% Agarosegelen unterworfen, mit Ethidiumbromid gefärbt und auf Nylon-Membranen (Gene Screen) übertragen. Die Filter wurden mit einem ³²P-markierten EcoRI-PstI-Fragment von etwa 1,4 kbp in der Mäuse-schweren Kette in 3'-Stellung von der Insertionsstelle geprüft (vgl. Diagramm 2). Zur weiteren Analyse wurde Genom-DNA aus ES-Zellen hergestellt, mit Restriktionsenzymen gemäß den Empfehlungen der Hersteller verdaut, und Fragmente wurden an 1%-Agarosegelen abgetrennt. DNA wurde auf Nylon-Membranen (Gene Screen) übertragen und mit dem ³²P-markierten Fragment gemäß den vorstehenden Angaben geprüft.

Analyse von G418-resistenten ES-Kolonien

Im ersten Experiment ergab die PCR-Analyse der gepoolten Kolonien ein positives PCR-Signal der erwarteten Größe (etwa 1,4 kbp) von 34 Pools entsprechend 136 G418-resistenten Kolonien. Die vier einzelnen Kolonien, die zu diesem positiven Pool beigetragen hatten, wurden einzeln durch PCR analysiert, und ein positiver Klon ES33D5 wurde identifiziert. Eine ähnliche Analyse von 540 G418-resistenten Kolonien, die im zweiten Experiment erhalten wurden, ergab vier weitere positive Klone (ES41-1, ES61-1, ES65-1, ES110-1).

Um die zielgerichtete Zerstörung von einer Kopie der J-Gene zu verifizieren (das Gen ist autosomal und somit in zwei Kopien vorhanden) wurden die PCR-positiven Klone expandiert, und genomische DNA wurde herge-

stellt, mit HindIII oder SacI verdaut und durch Southern-Analyse, wie beschrieben, unter Verwendung der EcoRI-PstI-Sonde analysiert.

Der Ersatz der J-Gene durch Insertion des Neomycin-Gens durch ein homologes Rekombinationsereignis führt zu einem HindIII-Fragment, das mit der EcoRI-PstI-Sonde, die etwa 1,9 kbp länger als das äquivalente Fragment im nativen Locus ist, aufgrund des Verlustes der beiden HindIII-Stellen in der deletierten J-Gen-Region nachweisbar ist (vgl. Diagramm 2C). Eine Southern-Analyse sämtlicher 5 positiven Klone durch HindIII-Verdau ergab ein Muster, das anzeigte, daß eine der beiden Kopien der schwere Ketten-J-Gene zerstört worden war. Es wurden 3 markierte Fragmente nachgewiesen: Ein Fragment (etwa 760 bp), in der Größe identisch mit dem in unbehandelten Zellen in der gleichen Intensität vorhandenen Fragment, ein Fragment (etwa 2,3 kbp) in der Größe identisch mit dem in unbehandelten Zellen vorhandenen Fragment, jedoch von verringerter Intensität im PCR-positiven Klon und ein weiteres Fragment von etwa 4,2 kbp mit der für ein homologes Rekombinationsereignis vorhergesagten Größe, das nur in PCR-positiven Klonen vorhanden ist. In ähnlicher Weise führt der Ersatz der J-Gene durch das Neomycin-Gen durch ein homologes Rekombinationsereignis zu einem Verlust von einer SacI-Stelle und dem Auftreten eines Fragments, das mit der EcoRI-PstI-Sonde, die etwa 570 bp kleiner als das äquivalente Fragment im nativen Locus ist, nachweisbar ist (vgl. Diagramm 2C). Eine Southern-Analyse der Klone durch SacI-Verdau ergab das erwartete Muster von einer nativen und einer zielgerichteten Allele: Etwa 4,0 kbp-Fragment, in der Größe identisch mit dem in unbehandelten Zellen nachgewiesenen Fragment, aber von verringerter Intensität in den 5 positiven Klonen und ein weiteres Fragment von etwa 3,4 kbp mit der für ein zielgerichtetes homologes Rekombinationsereignis vorhergesagten Größe, das nur in den identifizierten Klonen vorhanden war. Eine Rehybridisierung der Southern-Blots mit einer Sonde für das Neomycin-Gen zeigt, daß nur die 4,2 kbp- und 3,4 kbp-Fragmente, die sich aus der HindIII- und der SacI-Verdauung ergeben, mit der Sonde entsprechend der Vorhersage durch das Zielereignis hybridisierten.

Inaktivierung von Mäuse-Immunoglobulin-schwere Ketten-J-Genen in Mäusen

Injektion von zielgerichteten ES-Zellen in Mäuse-Blastocysten und Erzeugung von chimären Nachkommen

Mäuse wurden von den Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) bezogen. Dreieinhalb Tage alte C57BL/6-Blastocysten wurden von 4-5 Wochen alten

superovulierten weiblichen Tieren gemäß den Angaben von Koller et al., 1989 (a.a.O.) erhalten. ES-Zellen wurden trypsiniert, 1 mal mit frischem DMEM-Medium gewaschen und in M2-Medium auf etwa 1×10^6 /ml verdünnt. Etwa 5 μ l Zellen wurden zu einem 150 μ l-Tröpfchen des M2-Mediums unter Paraffinöl, das die Blastocysten enthielt, gegeben. 10 bis 15 Zellen wurden in das Blastozöl der einzelnen Blastocysten injiziert. 6 bis 9 ES-Zellen enthaltende Blastocysten wurden jeweils in das Uterushorn von C57BL/6 x DBA F1-pseudoträchtigen weiblichen Tieren, die 2,5 Tage vorher mit der Vasektomie unterzogenen männlichen Tieren gepaart worden waren, zurückgebracht. Die aus den injizierten Blastocysten entwickelten Jungen wurden etwa 16-18 Tage später geboren. Der Beitrag der ES-Zellen zu den Nachkommen wurde visuell durch Prüfung der Farbe des Fells der Jungen beurteilt. Die Blastocysten wurden von C57BL/6-Mäusen mit durchgehender schwarzer Färbung erhalten. Die ES-Zelllinie E14TG2a, d. h. die parentale Linie, aus der die Ziel-Zelllinien abgeleitet waren, wurden von 129/Ola-Mäusen isoliert. Dieser Mäusestamm ist cremefarben, d. h. die kombinierte Wirkung der drei Farbgene, die Dominante A^W -Allele des Agouti-Locus, die rezessive rosaäugige verwässerte Allele am p-Locus und die rezessive c^{ch} -Allele am C-Locus. Nachkommen, bei denen die ES-Zellen bei der Erzeugung des Tiers beteiligt waren, wiesen Fell mit braunem und cremefarbenem Haar auf. Die ES-Zelllinie ES41-1, die inaktivierte Mäuse Immunglobulin-schwere Ketten trug, wurde auf die vorstehend beschriebene Weise in C57BL/6-Mäuse-Blastocysten injiziert. 6 der 18 überlebenden Jungen wiesen eine hochgradige chimäre Fellfärbung (70-90%) auf. Die PCR-Analyse von DNA, die aus chimären neugeborenen Jungen eines weiblichen Tiers, dem Blastocysten nach Injektion der inaktivierten ES-Zellen implantiert worden waren, zeigten, daß der mutierte Immunglobulin-schwere Ketten-Locus in einer Vielzahl von Organen, wie Milz, Thymus, Niere, Leber, Gehirn und Haut, vorhanden ist.

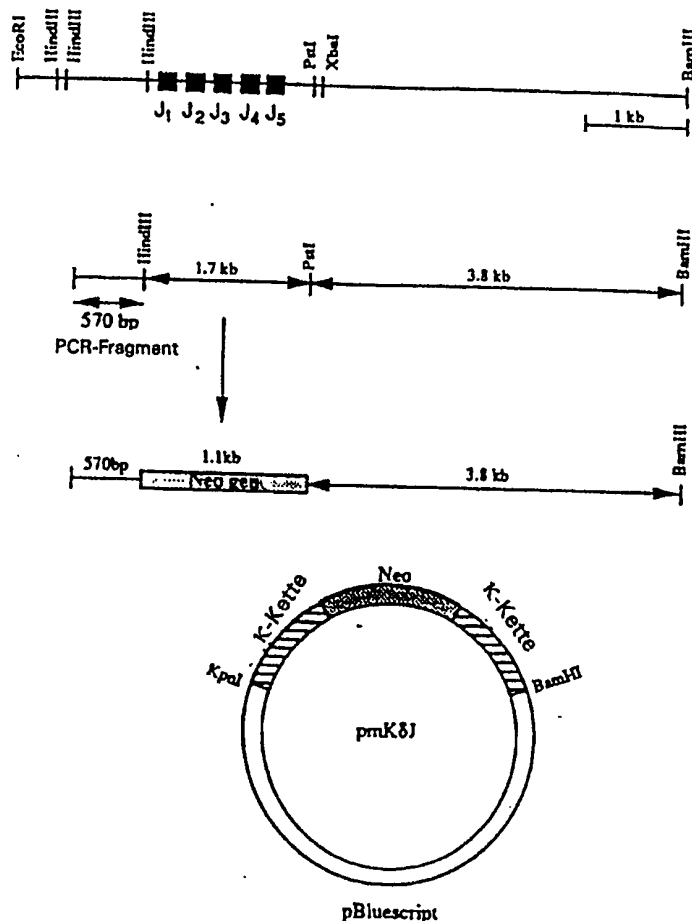
Inaktivierung der Mäuse-Ig-k-Kette J-Gene in ES-Zellen

Ein 5,6 kb-HindIII-BamHI-Fragment mit einem Gehalt an den Mäuse-Immunglobulin-k-Ketten-J-Region-Genen und den 3'-flankierenden Sequenzen, wurde aus einer Balb/c-Mäuseembryo-Genom-Bibliothek geklont und in pBluescriptSK-Vektor unter Bildung des Plasmids pKJ inseriert. pKJ wurde mit HindIII und PstI zur Deletion eines Fragments von etwa 1,7 kb mit einem Gehalt an den 5 J-Genen verdaut (vgl. Diagramm 3).

Ein 570 bp stumpfendiges HindIII-Fragment, das die Region in 5'-Richtung von der HindIII-Stelle neben der kJ-Region überspannt, wurde durch Poly-

merase-Kettenreaktion (PCR) aus Mäuse-Genom-DNA geklont. Dieses Fragment wurde in HindIII-SmaI-verdauten pIC-Klonierungsvektor (Marsh et al., Gene, Bd. 32 (1984), S. 481-485) inseriert und durch Verdauung mit KpnI-XhoI geschnitten. Ein XhoI-BamHI-Fragment von etwa 1,1 kb, das an der BamHI-Stelle abgestumpft war und das durch den Herpes simplex-Virus-Thymidin-kinase-Gen (HSV-tk)-Promotor gesteuerte Neomycin-Resistenzgen und einen Polyoma-Verstärker enthielt, wurde aus pMC1Neo isoliert (Thomas und Capecchi, 1987, a.a.O.). Das Neomycin-Fragment wurde in das HindIII-PstI-deletierte pKJ, das an der PstI-Stelle abgestumpft war, in 5'-Richtung zu den K-Sequenzen inseriert. Das erhaltene Plasmid wurde mit KpnI und XhoI verdaut, und das 570 bp-KpnI-XhoI-K-Fragment wurde in den KpnI-XhoI-gespaltenen Vektor in 5'-Richtung zum Neomycin-Gen inseriert, um den Inaktivierungsvektor zu bilden (pmK δ J, vgl. Diagramm 3). Die transkriptionelle Orientierung der Neomycin- und der K-Ketten-Gene ist die gleiche wie bei pmK δ J. Das Plasmid wurde vor Transfektion in ES-Zellen durch ApaI linearisiert. Die linearisierte Sequenz wies eine Homologie von etwa 3,8 kb und 570 bp zu den zellulären Sequenzen in 3'- und 5'-Stellung zum Neomycin-Gen auf.

Diagramm 3

 κ -Ketten-Inaktivierungsvektor

Analyse von G418-resistenten ES-Kolonien

Eine Elektroporation des κ -Inaktivierungsvektors in ES-Zellen und ein Screening auf homologe Rekombinationsereignisse wurde gemäß den Angaben zur Inaktivierung der Immunglobulin-schweren Kette durchgeführt. G418-resistente ES-Kolonien wurden auf die angestrebte homologe Rekombination durch PCR unter Verwendung der zwei Oligonucleotid-Primer CGGTTGCTGTTGTATCCATACTC und CATCAGAGCAGCCGATTGTCTG analysiert, die den Sequenzen im Mäuse-K-Kette-Gen etwa 67 bp in 5'-Richtung von der Inser-

tionsstelle bzw. etwa 370 bp in 3'-Richtung von der XhoI-Stelle des Neomycin-Gens entsprechen. Ein ^{32}P -markiertes Oligonucleotid mit 80 Basen, das etwa 10 bp 5' von der Insertionsstelle beginnt, wurde als Sonde zum Nachweis des beabsichtigten PCR-Produkts verwendet. Eine erfolgreiche homologe Rekombination ergibt ein Fragment von etwa 1030 bp. Die PCR-Analyse von 650 G418-resistenten Kolonien ergab 3 positive Kolonien (ES56-1, ES69-4, ES147-1). Eine Southern-Analyse dieser Kolonien bestätigte die Integration des Inaktivierungsvektors in 1 Allele der K-Immunoglobulin-Loci unter Bildung einer Deletion der J-Region.

Erzeugung von humanem Ig in transgenen Mäusen

Beispiel: Erzeugung von humaner schwerer Kette in transgenem Mäuse-DNA-Vektor

Ein SpeI-Fragment, das die humane schwere Kette-VH6-D-J-C μ -C δ -Region überspannt (Berman et al., EMBO J., Bd. 7 (1988), S. 727-738; vgl. Diagramm 4) wird aus einer humanen, in einem künstlichen Hefechromosom (YAC)-Vektor geklonten Bibliothek (Burke et al., Science, Bd. 236, S. 806-812) unter Verwendung von DNA-Sonden gemäß den Angaben von Berman et al., EMBO J., Bd. 7 (1988), S. 727-738 isoliert. Ein Klon wird erhalten, der auf etwa 100 kb geschätzt wird. Der isolierte YAC-Klon wird durch Gelelektrophorese mit gepulstem Feld (Burke et al., a.a.O.; Brownstein et al., Science, Bd. 244, S. 1348-1351) charakterisiert, wobei radioaktiv markierte Sonden für die humane schwere Kette verwendet werden (Berman et al., a.a.O.).

Einführung von YAC-Klonen in Embryonen

Hochmolekulare DNA wird in Agarose-Stopfen aus Hefezellen mit einem Gehalt an dem in Frage stehenden YAC (d. h. einem YAC mit einem Gehalt an dem vorerwähnten SpeI-Fragment aus dem IgH-Locus) hergestellt. Die DNA wird der Größenfraktionierung an einem CHEF-Gel-Apparat unterworfen, und die YAC-Bande wird aus dem Agarosegel von niedrigem Schmelzpunkt ausgeschnitten. Das Gelfragment wird mit Polyaminen äquilibriert und sodann geschmolzen und mit Agarase zur Verdauung der Agarose behandelt. Die mit Poly-amin- beschichtete DNA wird sodann in den männlichen Pronucleus von befruchteten Mäuseembryonen injiziert, die auf chirurgischem Wege auf die vorstehend beschriebene Weise in den Uterus eines pseudoträchtigen weiblichen Tiers eingeführt werden. Die transgene Natur der neugeborenen Tiere wird durch ein Slot-Blot von aus Schwänzen isolierter DNA analysiert. Die Bildung von humanen schweren Ketten wird analysiert, indem man

eine geringe Serummenge gewinnt und mit Kaninchen-anti-human-Antikörpern auf die Anwesenheit von Ig-Ketten testet.

Als eine Alternative zur Mikroinjektion wird YAC-DNA in Mäuse ES-Zellen durch ES-Zellen:Hefe-Protoplasten-Fusion übertragen (Traver et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Bd. 86 (1989), S. 5898-5902; Pachnis et al., *ibid.* Bd. 87 (1990), S. 5109-5113). Zunächst werden das Neomycin-Resistenz-Gen aus pMC1Neo und ein selektierbarer Hefe-Marker in nicht-essentielle YAC-Vektorsequenzen in einem Plasmid inseriert. Dieses Konstrukt wird zur Transformation eines Hefestammes mit einem Gehalt an IgH-YAC verwendet, und pMC1Neo wird durch homologe Rekombination in Vektorsequenzen des IgH-YAC integriert. Das modifizierte YAC wird sodann durch Protoplastenfusion in eine ES-Zelle übertragen (Traver et al., 1989; Pachnis et al., 1990), und erhaltene G418-resistente ES-Zellen, die die intakten humanen IgH-Sequenzen enthalten, werden zur Erzeugung von chimären Mäusen verwendet.

Erzeugung von humanem Ig durch chimäre Mäuse

Konstruktion eines humanen schwere Ketten-Ersatzvektors

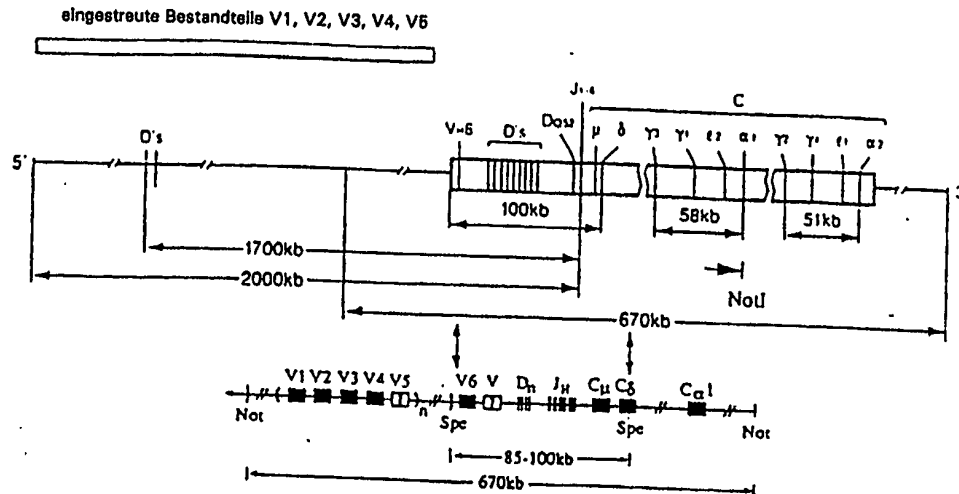
Die humanen Ersatzsequenzen umfassen das SpeI-100 kbp-Fragment von genomischer DNA, die die humane VH6-D-J-C μ -C δ -schwere Ketten-Region nach Isolation aus einer humanen YAC-Bibliothek auf die vorstehend beschriebene Weise umfaßt. Die flankierenden Mäuse-schwere Ketten-Sequenzen, die das homologe Rekombinations-Verdrängungsereignis steuern, enthalten ein 10 kbp-BamHI-Fragment der Mäuse-C ϵ -C α -schweren Kette und ein 5'-J558-Fragment mit der 5'-Hälfte des J558-Fragments der variablen Mäuse-schwere Ketten-Region an den 3'- bzw. 5'-Enden der humanen Sequenzen (Diagramm 4). Diese Mäuse-Sequenzen werden aus einer Mäuse-Embryo-Genom-Bibliothek unter Verwendung der von Tucker et al., PNAS USA, Bd. 78 (1981), S. 7684-7688 und Blankenstein und Krawinkel (1987, a.a.O.) beschriebenen Sonden isoliert. Das Fragment von 1150 bp XhoI bis BamHI mit einem Gehalt an einem Neomycin-Resistenz-Gen, das durch den Herpes simplex-Virus-Thymidin-kinase-Gen (HSV-tk)-Promotor gesteuert wird, und einen Polyom-Verstärker enthält, wird aus pMC1Neo (Koller und Smithies, 1989, a.a.O.) isoliert. Ein synthetischer Adaptor wird an dieses Fragment addiert, um das XhoI-Ende in ein BamHI-Ende überzuführen. Das erhaltene Fragment wird an BamHI-Mäuse-C ϵ -C α in einem Plasmid gebunden.

Aus dem YAC-Klon, der den humanen schwere Ketten-Locus enthält, werden DNA-Sequenzen von jedem Ende des Inserts entweder durch inverse PCR (Silverman et al., PNAS, Bd. 86 (1989), S. 7485-7489) oder durch Plasmid-

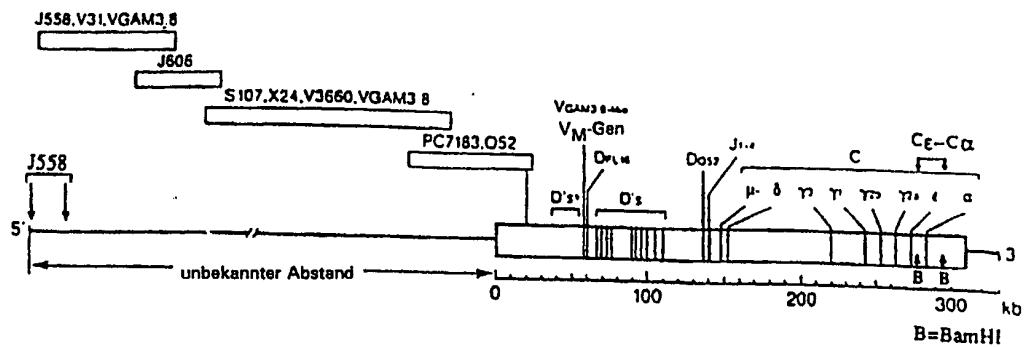
"Rettung" in *E. coli* (Burke et al., 1987; Garza et al., Science, Bd. 246 (1989), S. 641-646; Traver et al., 1989) gewonnen (vgl. Diagramm 4). Die isolierte humane Sequenz vom 5'-V6-Ende des YAC wird an die Mäuse-J558-Sequenz in einem Plasmid ligiert und ebenso wird die vom 3'C δ -Ende des YAC abgeleitete humane Sequenz an das Neo-Gen im vorstehend beschriebenen Plasmid mit einem Gehalt an Neo und Mäuse-C ϵ -C α ligiert. Das humane V6-Mäuse-J558-Segment wird nunmehr in einen halben YAC-Klonierungsvektor subkloniert, der einen selektierbaren Hefe-Marker (HIS3), der in originalem IgH-YAC nicht vorhanden ist, ein Centromeres (CEN) und ein einzelnes Telomeres (TEL) enthält. Das humane C δ -Neo-Mäuse-C ϵ -C α wird ebenfalls in einen separaten halben YAC-Vektor mit einem unterschiedlichen selektierbaren Hefe-Marker (LEU2) und einem einzelnen TEL subkloniert. Der halbe YAC-Vektor mit einem Gehalt an der humanen V6-DNA wird linearisiert und zur Transformation eines Hefestammes verwendet, der in bezug auf die chromosomalen HIS3- und LEU2-Loci deletiert ist und der das IgH-YAC trägt. Eine Selektion auf Histidin-Prototrophie ergibt Hefekolonien, die eine homologe Rekombination zwischen den humanen V6-DNA-Sequenzen erfahren haben und ein rekombinantes YAC enthalten. Der halbe YAC-Vektor mit einem Gehalt an der humanen C δ -DNA wird sodann linearisiert und zur Transformation des in der vorstehenden Stufe erzeugten Hefestammes verwendet. Eine Selektion auf Leucin-Prototrophie ergibt einen Hefestamm mit einem Gehalt an dem vollständigen IgH-Ersatz-YAC (vgl. Diagramm 4). Dieses YAC wird isoliert und durch Mikroinjektion auf die vorstehend für Embryonen beschriebene Weise in ES-Zellen eingeführt.

Diagramm 4

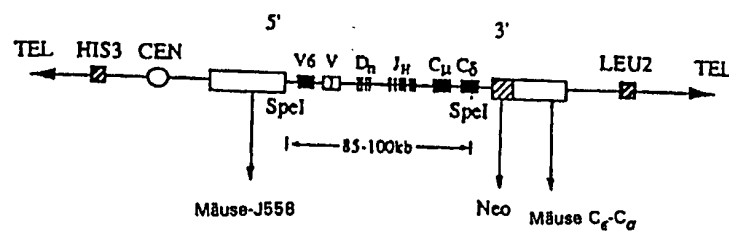
(A) Humaner schwere Ketten-Locus



(B) Mäuse-schwere Ketten-Locus



(C) Humaner schwere Ketten-Ersatz-YAC-Vektor



Gemäß den vorstehenden Verfahren läßt sich ein antigener oder chimärer Nichtprimaten-Wirt, insbesondere ein Mäusewirt erzeugen, der zur Bildung von humanen Antikörpern oder Analogen, die für ein Immunogen spezifisch sind, immunisiert werden kann. Auf diese Weise werden die Probleme bei der Bereitstellung von humanen monoklonalen Antikörpern vermieden, da Mäuse mit Immunogenen immunisiert werden können, die bei einem humanen Wirt nicht eingesetzt werden können. Ferner lassen sich Auffrisch-Injektionen und Adjuvantien bereitstellen, deren Bereitstellung bei einem humanen Wirt nicht möglich wäre. Die erhaltenen B-Zellen können sodann zur Immortalisierung für die kontinuierliche Erzeugung des gewünschten Antikörpers eingesetzt werden. Die immortalisierten Zellen können zur Isolierung der Gene, die für das Immunglobulin oder ein Analoges kodieren, verwendet werden und der Mutation durch in vitro-Mutagenese oder eine andere Mutagenisierungstechnik unterworfen werden, um die Eigenschaften der Antikörper zu modifizieren. Diese mutagenisierten Gene können in die immortalisierten Zellen zur homologen Rekombination zurückgeführt werden, um eine kontinuierliche Säugetier-Zellquelle für die gewünschten Antikörper bereitzustellen. Die vorliegende Erfindung stellt eine zweckmäßige Quelle für humane Antikörper bereit, wobei die humanen Antikörper in analoger Weise wie bei der Herstellung von Antikörpern in einem humanen Wirt gebildet werden. Die Mäusezellen sorgen in zweckmäßiger Weise für die Aktivierung und Umlagerung von humaner DNA in Mäusezellen zur Bildung der humanen Antikörper.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Transgenes Nichtprimaten-Säugetier, enthaltend ein modifiziertes Genom, wobei die Modifikation eine Läsion in der J-Region von mindestens einer Kopie des Immunoglobulin-schwere Ketten-Locus umfaßt, wobei diese Läsion zur Unfähigkeit dieser Kopie des Locus zur Umlagerung oder zur Erzeugung einer funktionellen Botschaft, die für eine Immunoglobulin-schwere Ketten-Untereinheit kodiert, führt.
2. Säugetier nach Anspruch 1, wobei die Modifikation ferner eine Läsion in mindestens einer Kopie eines Immunoglobulin-leichte Ketten-Locus umfaßt, wobei die Läsion zur Unfähigkeit des Locus zur Umlagerung oder zur Erzeugung einer funktionellen Botschaft, die für die leichte Ketten-Untereinheit kodiert, führt.
3. Säugetier nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Modifikation Läsionen in zwei Kopien des Immunoglobulin-schwere Ketten-Locus und/oder Läsionen in zwei Kopien des Immunoglobulin-leichte Ketten-Locus umfaßt.
4. Säugetier nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Modifikation ferner den Einbau eines Immunoglobulin-Locus, der für eine xenogene leichte Kette oder schwere Kette oder beides kodiert, in das Genom umfaßt.
5. Transgenes Nichtprimaten-Tier nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei es sich beim Nichtprimaten-Säugetier um eine Maus handelt.
6. Transgenes Nichtprimaten-Säugetier nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei es sich beim xenogenen Immunoglobulin um ein humanes Immunoglobulin handelt.
7. Transgenes Nichtprimaten-Säugetier nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei das xenogene Ig eine variable Region umfaßt, die durch eine Peptidbindung mit einem Peptid verbunden ist, das von der bloßen konstanten Ig-Region abweicht.
8. Embryonale Stammzelle (ES) eines Nichtprimaten-Säugetiers, enthaltend ein modifiziertes Genom, wobei die Modifikation eine Läsion in mindestens einer Kopie der J-Region des Immunoglobulin-schwere Ketten-Locus umfaßt, wobei die Läsion zur Unfähigkeit der Kopie des Locus zur Um-

lagerung oder zur Erzeugung einer funktionellen Botschaft, die für eine Immunoglobulin-schwere Ketten-Untereinheit kodiert, führt; und

die ggf. ferner folgendes enthält:

a) eine Läsion in mindestens einer Kopie eines Immunoglobulin-leichte Ketten-Locus, wobei die Läsion zur Unfähigkeit des Locus zur Umlagerung oder zur Erzeugung einer funktionellen Botschaft, die für die leichte Ketten-Untereinheit kodiert, führt; und/oder

b) Einbau in das Genom der ES-Zellen eines Immunoglobulin-Locus, der für eine xenogene leichte Kette oder schwere Kette oder beides kodiert.

9. Verwendung der ES-Zelle nach Anspruch 8 zur Erzeugung eines transgenen Nichtprimaten-Säugetiers.

10. Verfahren zur Erzeugung von xenogenen Antikörpern gegen ein Antigen, wobei das Verfahren folgendes umfaßt: Immunisieren des transgenen Nichtprimaten-Säugetiers nach Anspruch 4 mit einem Antigen, um eine Sekretion von Antikörpern durch mindestens einige der B-Zellen des Säugetiers in den Blutstrom herbeizuführen; und

(a) Gewinnen der Antikörper aus dem Blutstrom des Tiers; oder

(b) Durchführen eines Verfahrens, das folgendes umfaßt:

- Gewinnen von B-Zellen aus dem Tier;

- Immortalisieren der B-Zellen;

- Screening der immortalisierten B-Zellen auf solche immortalisierte B-Zellen, die die Antikörper sekretieren; und

- Gewinnen der Antikörper; oder

(c) Durchführen beider Verfahren (a) und (b).

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die xenogenen Antikörper human sind.

12. Immortalisierte B-Zellen, die Antikörper sekretieren, die mit einem spezifischen Antigen immunoreaktiv sind, wobei die immortalisierten B-Zellen von einem transgenen Nichtprimaten-Säugetier nach Anspruch 4, dem das Antigen verabreicht worden ist, abgeleitet sind.

13. Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern, die mit einem gewünschten Antigen immunoreaktiv sind, wobei das Verfahren folgendes umfaßt: Züchten der immortalisierten B-Zellen nach Anspruch 12 unter Bedingungen, bei denen die Antikörper sekretiert werden; und

- Gewinnen der Antikörper aus der Kultur.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Antikörper eine variable Region umfassen, die durch eine Peptidbindung mit einem Peptid verbunden ist, das von der bloßen konstanten Ig-Region abweicht.

15. Verfahren zur Erzeugung eines transgenen Nichtprimaten-Säugetiers, das ein modifiziertes Genom enthält, wobei das Verfahren folgendes umfaßt: Erzeugen einer Läsion in der J-Region von mindestens einer Kopie des Immunoglobulin-schwere Ketten-Locus, wobei die Läsion zur Unfähigkeit der Kopie des Locus zur Umlagerung oder zur Erzeugung einer funktionellen Botschaft, die für eine Immunoglobulin-schwere Ketten-Untereinheit kodiert, führt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das Verfahren ferner folgendes umfaßt: Erzeugung einer Läsion in mindestens einer Kopie eines Immunoglobulin-leichte Ketten-Locus, wobei die Läsion zur Unfähigkeit des Locus zur Umlagerung oder zur Erzeugung einer funktionellen Botschaft, die für die leichte Ketten-Untereinheit kodiert, führt.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, wobei das Verfahren die Erzeugung einer Läsion in zwei Kopien des Immunoglobulin-schwere Ketten-Locus und/oder von Läsionen in zwei Kopien des Immunoglobulin-leichte Ketten-Locus umfaßt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei das Verfahren den Einbau eines Immunoglobulin-Locus, der für eine xenogene leichte Kette oder eine schwere Kette oder beides kodiert, in das Genom umfaßt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei es sich beim Nichtprimaten-Säugetier um eine Maus handelt.

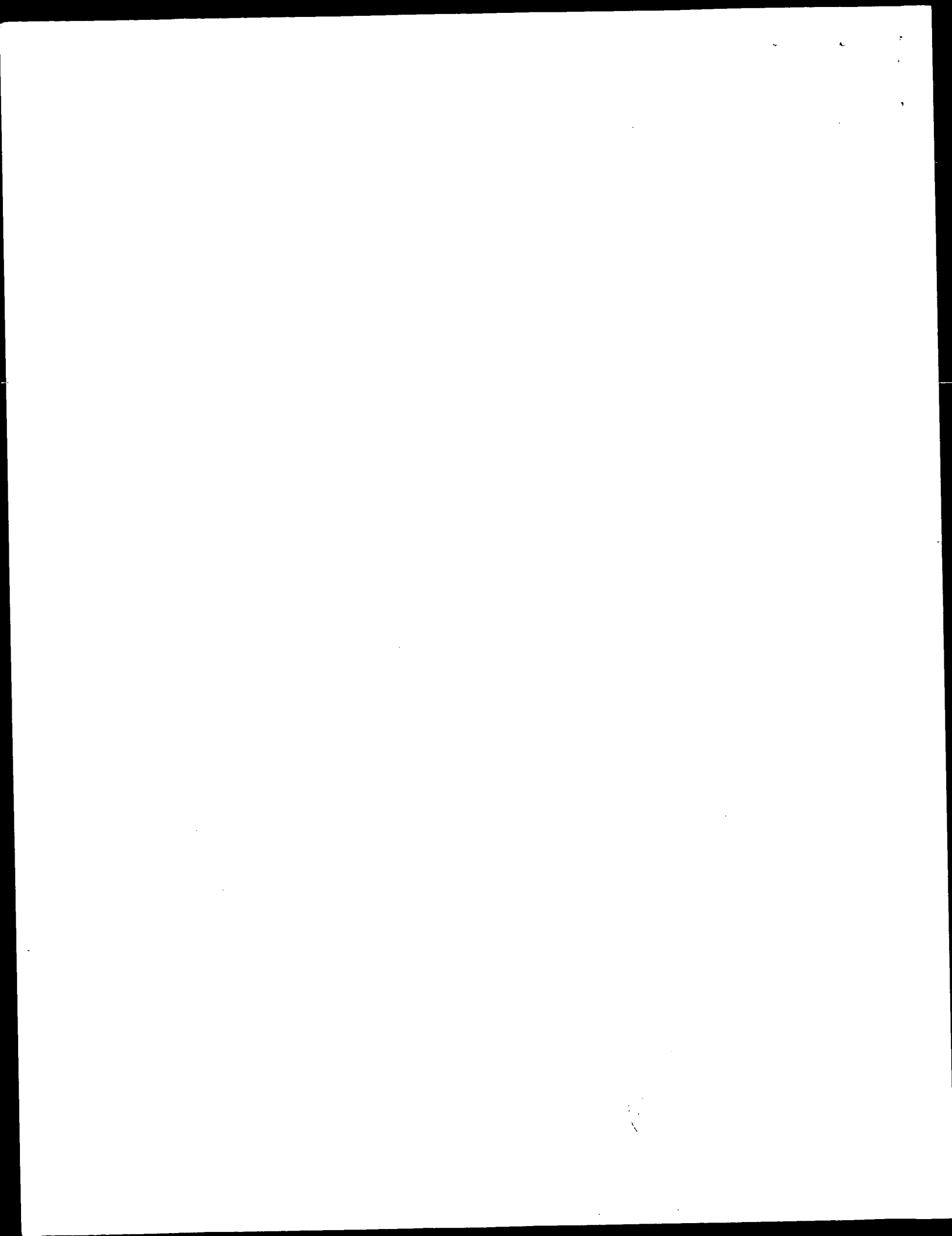
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, wobei das xenogene Immunoglobulin human ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei das xenogene Ig eine variable Region umfaßt, die durch eine Peptidbindung an ein Peptid gebunden ist, das von der bloßen konstanten Ig-Region abweicht.

22. Verfahren zur Erzeugung einer embryonalen Stammzelle (ES) eines Nichtprimaten-Säugetiers, enthaltend ein modifiziertes Genom, wobei das Verfahren folgendes umfaßt: Erzeugen einer Läsion in mindestens einer Kopie der J-Region des Immunoglobulin-schwere Ketten-Locus, wobei die Läsion zur Unfähigkeit der Kopie des Locus zur Umlagerung oder zur Erzeugung einer funktionellen Botschaft, die für eine Immunoglobulin-schwere Ketten-Untereinheit kodiert, führt; und

wobei das Verfahren ggf. ferner folgendes umfaßt:

(a) Erzeugen einer Läsion in mindestens einer Kopie eines Immunoglobulin-leichte Ketten-Locus, wobei die Läsion zur Unfähigkeit des Locus zur Umlagerung oder zur Erzeugung einer funktionellen Botschaft, die für die leichte Ketten-Untereinheit kodiert, führt; und/oder



(b) Einbau in das Genom der ES-Zellen eines Immunoglobulin-Locus, der für eine xenogene leichte Kette oder schwere Kette oder beides kodiert.

23. Verfahren zur Erzeugung von immortalisierten B-Zellen, die Antikörper sekretieren, die mit einem spezifischen Antigen immunoreaktiv sind, wobei das Verfahren die Ableitung der immortalisierten B-Zellen aus einem transgenen Nichtprimaten-Säugetier nach Anspruch 4 oder 18, dem das Antigen verabreicht worden ist, umfaßt.

